

Aus dem Institut für Veterinärbakteriologie  
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. M. M. Wittenbrink

**Serodiagnostik der bovinen *Mycobacterium avium* subspecies  
*paratuberculosis*-Infektion: Vergleich von zwei Testsystemen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von  
**Pamela Layla Monti**  
Tierärztin  
aus Cadempino, Schweiz

genehmigt auf Antrag von  
Prof. Dr. M. M. Wittenbrink, Referent  
PD Dr. M. Hässig, Korreferent

Zürich, 2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Summary</b> .....	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>Schrifttum</b>	
4.1	Paratuberkulose - Erregereigenschaften und Verbreitung .....	6
4.2	Pathogenese und Klinik der Paratuberkulose.....	8
4.3	Diagnose der Paratuberkulose .....	10
4.3.1	Direkter Erregernachweis .....	10
4.3.2	Indirekter Erregernachweis.....	11
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	
5.1	Probenmaterial .....	14
5.2	Vorbereitung des Antigens für die Präadsorption .....	16
5.3	Serologische Untersuchungen .....	17
5.3.1	Svanovir®-Elisa.....	18
5.3.2	Pourquier®-Elisa .....	19
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b>	
6.1	Untersuchung von Rinderseren in beiden Testverfahren mit und ohne Präadsorption .....	20
6.2	Untersuchung von Rinderseren aus der Klinik und aus einer Serumbank.....	22
<b>7</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>23</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>26</b>
<b>9</b>	<b>Curriculum vitae</b> .....	<b>34</b>

## 1 Zusammenfassung

### Serodiagnostik der bovinen *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-Infektion: Vergleich von zwei Testsystemen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung von zwei kommerziellen ELISA-Tests (Svanovir<sup>®</sup>- und Pourquier<sup>®</sup>-ELISA) für den Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium (M.) avium* subspecies *paratuberculosis* in Rinderseren untersucht. Dabei wurde insbesondere der Einfluss einer Präadsorption von Serumproben mit *M. phlei* auf die Spezifität des Antikörpernachweise geprüft. In einer Untersuchung an 38 spezifizierten Rinderseren wurden beide Tests nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Im Pourquier<sup>®</sup>-ELISA reagierten lediglich sechs der 20 Seren (30,0%), die im Svanovir<sup>®</sup>-ELISA als positiv detektiert wurden, ebenfalls positiv. Die relativ hohe Anzahl an fraglichen Reagenten im Svanovir<sup>®</sup>-ELISA konnte im Pourquier<sup>®</sup>-ELISA nicht bestätigt werden. Zur Klärung der Frage, ob die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen den beiden Tests auf einer erhöhten Rate an falsch-positiven Reaktionen im Svanovir-ELISA beruht, in dem im Gegensatz zum Pourquier-ELISA unbehandelte Seren untersucht werden, wurde der Pourquier<sup>®</sup>-ELISA zunächst ohne die vom Hersteller vorgeschriebene Präadsorption der Seren mit einer Präparation aus *M. phlei* durchgeführt. Die so erhaltenen Ergebnisse stimmten mit denen des Svanovir<sup>®</sup>-ELISAs weitgehend überein. Anschliessend wurde die Beeinflussung der Spezifität der beiden ELISA-Systeme durch die Präadsorption der Serumproben untersucht. Für die Absorptionsversuche wurden die Mykobakterien-Stämme *M. avium* ssp. *avium*, *M. phlei* und *M. avium* ssp. *paratuberculosis* verwendet. Unsere Untersuchungen haben dabei eindeutig gezeigt, dass die höhere Spezifität des Pourquier<sup>®</sup>-ELISA auf der Präadsorption der Testseren mit *M. phlei* beruht, durch die kreuzreagierende unspezifische Antikörper eliminiert werden. Die Untersuchung von 635 Serumproben, die für die einzelnen Kantone repräsentativ aus einer vorhandenen Rinderseren-Datenbank ausgewählt wurden, ergab im Pourquier<sup>®</sup>-ELISA eine MAP-Seroprävalenz von 0.2 %. Dieser Wert stimmt in etwa mit Resultaten einer früheren serologischen Untersuchungen in der Schweiz (0.7 %) überein.

## 2 Summary

### **Serodiagnostic of the bovine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection: Comparison of two ELISA tests**

In the present study the suitability of two commercial ELISA-tests (Svanovir®- und Pourquier®-ELISA) for the detection of antibodies against *Mycobacterium* (*M.*) *avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle sera was studied. In particular, the influence of a pre-adsorption of serum samples with *M. phlei* on the specificity of antibody detection was tested. The study comprising 38 specified bovine sera adhered to the producer's requirements for both tests. In the Pourquier®-ELISA only six of the 20 sera which in the Svanovir®-ELISA were tested positive (30,0%) reacted positive as well. The rather high number of questionable results of the Svanovir®-ELISA could not be confirmed by the Pourquier®-ELISA. In order to find out if the discrepancy amongst the results of the two tests originated in the higher rate of false-positive reactions in the Svanovir®-ELISA where, contrary to the Pourquier®-ELISA, untreated sera are tested, the Pourquier®-ELISA was initially carried out without the pre-adsorption of the sera with a preparation of *M. phlei* as required by the producer. These results were almost equal to those of the Svanovir®-ELISA. Then, the influence on the specificity of both ELISA systems caused by the pre-adsorption of the test sera was studied. For the absorption tests the mycobacteria strains *M. avium* ssp. *avium*, *M. phlei* und *M. avium* ssp. *paratuberculosis* were used. Our tests showed clearly that the higher specificity of the Pourquier®-ELISA originates in the pre-adsorption of the test sera with *M. phlei* by which cross-reactive unspecific antibodies are eliminated. Testing 635 sera samples – chosen for each canton representatively from an existing pool of swiss bovine sera – resulted in a MAP sero-prevalence of 0.2 % for the Pourquier®-ELISA. This value more or less agrees with the results of an earlier serological survey carried out in Switzerland (0.7%).

### 3 Einleitung

Die Paratuberkulose (Johne'sche Krankheit) ist eine bakterielle Infektionskrankheit, die durch *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) hervorgerufen wird. Rinder, die mit MAP infiziert sind, erkranken nach einer langen Inkubationszeit an einer chronischen, therapieresistenten, granulomatösen Enteritis, die nach zwei bis fünf Jahren zum Tod des Tieres führen kann.

Nicht alle infizierten Tiere entwickeln klinische Symptome. Subklinisch infizierte Tiere stellen das grösste Problem dar, da sie Bakterien mit dem Kot über einen langen Zeitraum ausscheiden und deshalb eine ständige Infektionsquelle im Tierbestand sind.

Die Paratuberkulose hat in den letzten Jahren an grosser Bedeutung gewonnen; u.a. durch Berichte über eine mögliche Rolle von MAP bei der Entstehung des Morbus Crohn beim Menschen.

In der Schweiz ist die tatsächliche Verbreitung und ökonomische Bedeutung der bovinen Paratuberkulose unklar. Die Krankheit wird selten diagnostiziert und jährlich werden durchschnittlich neun Fälle dem Bundesamt für Veterinärwesen (<http://www.bvet.ch/admin>) gemeldet. Vor sieben Jahren konnte in einer serologischen Studie eine Seroprävalenz auf Herdenbasis von 8.0% bestimmt werden (STÄRK et al., 1997).

Die heute verfügbaren Tests für die Diagnose der Paratuberkulose sind ungeeignet, um infizierte Tiere in allen Infektionsstadien zu identifizieren. Der Nachweis von MAP-Ausscheidern wird am sichersten durch die Anzüchtung des Erregers aus Kotproben erreicht. Diese Technik ist aber sehr zeitintensiv und benötigt mindestens 16 Wochen für eine sichere Diagnose. Deshalb finden kommerziell erhältliche serologische Tests aufgrund niedrigerer Kosten, der Schnelligkeit des Tests und der hohen Spezifität immer breitere Anwendung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Validität zweier kommerziell verfügbarer ELISA-Kits untersucht werden (Svanovir®- und Pourquier®-ELISA). Dabei sollte geprüft werden, ob eine Präadsorption der Proben mit *M. phlei* die Spezifität dieser Nachweismethoden beeinflusst.

## 4 Schrifttum

### 4.1 Paratuberkulose – Erregereigenschaften und Verbreitung

Der Erreger der Paratuberkulose, *Mycobacterium (M.) avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP), wurde erstmals im Jahre 1895 von JOHNE und FROTHINGHAM beschrieben. Sie fanden im Darm von Rindern mit chronischer Enteritis unbekannter Ätiologie säurefeste Stäbchen und beschrieben das Krankheitsbild wegen der Ähnlichkeit des Erregers mit dem der Tuberkulose als eine besondere Form der Darmtuberkulose. 1911 wurden erste Berichte über die erfolgreiche Erregeranzüchtung veröffentlicht (TWORT und INGRAM, 1912).

MAP ist ein 0,3-0,5 µm breites und 1-1,5 µm langes, unbewegliches, aerobes Bakterium. Ein besonderes Charakteristikum ist die Säure-Alkohol-Festigkeit. Diese beruht auf dem besonderen Aufbau der Zellwand, die sich durch einen hohen Gehalt an Lipiden und Mykolsäuren auszeichnet. Weitere Komponenten der Zellwand sind Peptidoglykane, langkettige Fettsäuren, die mit Arabinogalaktan gekoppelt sind und Peptidoglykolipide (CLARKE, 1997). Lipoarabinomannan (LAM) ist eine weitere wichtige Zellwandkomponente, die in der Zellmembran verankert ist und von dort in die Zellwand reicht. Sie hat eine immunmodulatorische Funktion, in dem sie die Aufnahme des Erregers über Mannose-Rezeptoren in den Makrophagen vermittelt (BRENNAN und NIKAIDO, 1995).

Im Vergleich zu den anderen Bakterien der Familie *Mycobacteriaceae*, stellt MAP hohe Ansprüche an die Wachstumsbedingungen. Das Wachstum des Erregers ist von Mycobactin abhängig. Mycobactin, das erstmals aus *M. phlei* isoliert wurde, ist ein zellwandständiges Siderophor, das von diversen Mykobakterien ausser MAP gebildet wird und zur Bereitstellung des essentiellen Eisens dient (WHEELER und RATLEDGE, 1994). Die in vitro-Abhängigkeit von diesem wachstumsfördernden Eisenchelatbildner ist das wichtigste Merkmal zur phänotypischen Identifizierung von MAP.

Die Wachstumsgeschwindigkeit ist verglichen mit anderen Mycobakterien sehr viel langsamer. Das Harrold's Medium, mit Mycobactin J und Eidotter angereichert, stellt das Standardmedium für MAP dar. Die Kulturen werden bei 37°C inkubiert. Erste Kolonien sind nach 4 Wochen sichtbar (HERMANN, 1998); i.d.R. dauert es 14-16 Wochen bevor das Wachstum von kleinen, glatten, weissen, konvexen Kolonien, die typisch für MAP sind, sichtbar wird (WHITLOCK RH, 1991).

MAP ist dank seiner Zellwandbeschaffenheit äusserst resistent gegenüber Umweltfaktoren. Die Überlebensdauer in Mist und Gülle beträgt bis zu neun Monaten (GAY und SHERMAN, 1992; JØRGENSEN, 1977) und im Boden bis zu elf Monaten. Boden-pH-Wert, Bestandsmanagement und andere Faktoren wie zum Beispiel das Klima können die Überlebensfähigkeit des Erregers in der Umwelt beeinflussen (KENNEDY und BENEDICTUS, 2001). Durch saure pH-Bedingungen im Boden kann sich die Tenazität des Erregers noch erhöhen (RICHARDS, 1988).

Die Auswahl an wirksamen Desinfektionsmitteln ist wegen der hohen Tenazität des Erregers äusserst begrenzt. Viele sind unwirksam gegen MAP, vor allem im Kot. Die höchste Wirksamkeit haben Formaldehyd-haltige Desinfektionsmittel.

Ein besonderes Problem stellt die hohe Thermotoleranz von MAP in der Milch dar. 1998 berichteten SUNG und COLLINS, dass MAP die *high temperature, short time* (HTST)-Pasteurisation überleben kann, wenn über  $10^1$  koloniebildende Einheiten (KBE) je ml Milch vorhanden sind. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass MAP die kommerzielle Milchpasteurisierung überleben kann, weshalb Milch als potentielle Infektionsquelle für den Menschen anzusehen ist.

Die Paratuberkulose ist eine Darmerkrankung der Wiederkäuer. Das bedeutet, dass sie nicht nur bei Rind, Schaf und Ziege sondern auch bei Wild- und Zoowiederkäuern vorkommen kann (CHIODINI und VAN KRUIJNINGEN, 1983; WEBER et al., 1991; CLARKE, 1997).

Der Erreger konnte bei Reh- und Rotwild nachgewiesen werden, wobei die Krankheit durch die geringe Bestandsdichte in der Natur kaum verbreitet werden konnte. Nur die Gehegehaltung könnte wegen einer Erhöhung der Bestandesdichte ein Problem darstellen (WEBER et al., 1991).

Bei Monogastriern konnte eine natürliche Infektion bei Pferd, Schwein und Hund nachgewiesen werden (LIÉNAUX, 1913; RUNNELS, 1955; VOGEL, 1977). Dabei kommt es zu einer Vermehrung des Erregers aber in der Regel nicht zur klinischen Erkrankung (CHIODINI et al., 1984).

Die Paratuberkulose ist in allen Erdteilen verbreitet, kommt jedoch vor allem in Europa vor, wo sie in England, Norddeutschland, Dänemark, Niederlande und Frankreich gebietsweise stärker verbreitet ist. In vielen europäischen Ländern wurden bisher keine flächendeckenden Untersuchungen durchgeführt. Ferner sind die Angaben über die Prävalenzen nur bedingt miteinander vergleichbar, da ihnen in der Regel verschiedene diagnostische Systeme zugrunde liegen und zwischen

Untersuchungen der Einzeltierprävalenz und Bestandesprävalenz differenziert werden muss. So kann nur ein lückenhafter Überblick gegeben werden.

Generell lässt sich beobachten, dass die Prävalenzen von MAP-Infektionen in Milchviehbeständen höher sind als in Fleischrinderbeständen. Dies hängt möglicherweise mit den intensiveren Haltungsbedingungen und dem damit verbundenen höheren Infektionsdruck durch kontaminierten Kot innerhalb eines Milchviehbetriebes zusammen (MERKAL et al., 1987; BRAUN et al., 1990).

Die Seroprävalenz innerhalb der Milchkühe in der Schweiz beträgt auf der Grundlage eines kommerziellen ELISAs (Commonwealth Serum Laboratories) auf der Einzeltierebene nur 0,7% (STÄRK et al., 1997).

#### **4.2 Pathogenese und Klinik der Paratuberkulose**

Die Paratuberkulose des Rindes entwickelt sich schleichend. Die Inkubationszeit kann sehr stark variieren und sechs Monate bis zu fünf Jahre betragen. Das Eintreten von Stressfaktoren wie Geburt, Laktationshöchstleistung, andere Infektionskrankheiten, welche die Immunabwehr des Tieres herabsetzen können, begünstigen den Ausbruch der Erkrankung.

Die ersten Symptome sind Gewichtverlust trotz guter Fresslust. Desweiteren tritt Durchfall auf. Die Durchfälle sind am Anfang intermittierend und werden im weiteren Verlauf der Krankheit unstillbar. Die Folge sind Abmagerung, Verringerung der Milchleistung und Dehydratation.

Es werden vier verschiedene Infektionsstadien unterschieden (SCANLAN und MACK, 1988) :

- 1) Latente Infektion (Kälber und Rinder): Die Tiere werden als Kälber infiziert. Der Erreger vermehrt sich in der Darmmukosa und den regionalen Lymphknoten, ist aber nur schwierig nachweisbar (post mortem durch Kultur aus Gewebematerial).
- 2) Latente Infektion (adulte Träger): Sie haben keinen Durchfall aber es sind spezifische Antikörper nachweisbar und/oder die Tiere zeigen eine gestörte Immunantwort und sind dadurch anfälliger für andere Krankheiten wie z. B. Mastitis oder Infertilität.



- 3) Klinisch erkrankte Tiere: Dieses Stadium ist durch intermittierenden Durchfall und Gewichtsverlust charakterisiert. Es entwickeln sich langsam eine Kachexie und eine sinkende Milchleistung. Die meisten Tiere in diesem Stadium sind in der Kotkultur positiv und haben erhöhte Titer an spezifischen Antikörpern.
- 4) Fortgeschrittenes klinisches Stadium: Tiere in diesem Stadium sind extrem abgemagert, schwach und haben profusen Durchfall. Intermandibuläre Ödeme oder „bottle jaw“ sind für dieses Stadium charakteristisch (Hypoproteinämie).

Für jedes Tier in Stadium 4 wird vermutet, dass im Bestand 15 bis 25 weitere Tiere mit dem Erreger der Paratuberkulose infiziert sind (*iceberg effect*; WHITLOCK, 1991).

Da die Symptome unspezifisch sind, ist die klinische Diagnose der Paratuberkulose schwierig und in den meisten Fällen kann lediglich eine Verdachtsdiagnose gestellt werden.

Am empfänglichsten sind Kälber in den ersten sechs Lebensmonaten (COLLINS, 1994). Ihre Empfänglichkeit nimmt dann progressiv ab; es entwickelt sich eine altersabhängige Resistenz. Diese ist im Alter von einem Jahr mit der von einer adulten Kuh vergleichbar (SWEENEY, 1996). Rinder über zwei Jahre gelten in der Regel als resistent gegen eine Infektion (KLEE, 1986). Ein Teil der infizierten Tiere bleibt lebenslang latent infiziert, ist aber Dauerausscheider und stellt für die ganze Herde eine Infektionsquelle dar. Die Krankheitssymptome treten oft erst während der ersten Laktation oder später auf. Belastungsfaktoren wie Intensivhaltung, schlechte Fütterung, Stressfaktoren wie z. B. Transport oder Abkalbung und Umweltfaktoren können eine Infektion begünstigen. Die Schwere der klinischen Erscheinungen scheint mit zunehmendem Alter bei der Erstinfektion deutlich herabgesetzt zu sein (CHIODINI et al., 1984). Die Frage einer Rassedisposition wird diskutiert. Einige Rinderrassen wie Jersey, Shorthorn, Holstein-Friesian und Guernsey scheinen besonders häufig infiziert zu sein (ROSENBERGER, 1978; CHIODINI et al., 1984; SPACKMAN, 1984). Allerdings konnte dieser Sachverhalt auch darin begründet sein, dass diese Rassen in bestimmten Regionen vorherrschen, wo aufgrund von Umwelt- und Belastungsfaktoren ein höherer Infektionsdruck herrscht.

Der Erreger der Paratuberkulose wird im Kot erkrankter und latent infizierter Tiere ausgeschieden und mit Futter und Trinkwasser aufgenommen. Die Erregerausscheidung beginnt etwa drei bis fünf Monate nach der Infektion. Klinisch

krankte Tiere können mehr als  $10^8$  Keime pro Gramm Kot ausscheiden (CHIODINI und HERMON-TAYLOR, 1993). Die Ansteckung über Futter erfolgt sowohl auf der Weide als auch im Stall. Für die Kälber stellt kontaminierte Milch und Kolostrum die wichtigste Ansteckungsquelle dar. Milch spielt eine wichtige Rolle in der Verbreitung der Krankheit. Etwa ein Drittel klinisch erkrankter Kühe scheidet MAP mit der Milch aus (TAYLOR et al., 1981). Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass der Erreger über hämatogene/lymphogene Infektionswege in das Euter und die benachbarten Lymphknoten gelangt. Aufgrund dieser Ergebnisse empfehlen die Autoren in den von Paratuberkulose betroffenen Betrieben, Kälber generell mit Milchaustauscher zu füttern.

Häufig sind bereits die Feten von an Paratuberkulose erkrankten Rindern infiziert, so dass als Infektionsweg auch die intrauterine Übertragung in Frage kommt. Als Infektionsquelle und Ausscheider gelten auch männliche Tiere. Schon 1970 zeigten LARSEN und KOPECKY, dass klinisch erkrankte Bullen MAP mit dem Sperma ausscheiden. 1981 wiesen LARSEN et al. eine intermittierende Erregerausscheidung in subklinisch infizierten Bullen nach.

### **4.3 Diagnose der Paratuberkulose**

#### **4.3.1 Direkter Erregernachweis**

##### *Mikroskopischer Erregernachweis*

Der mikroskopische Erregernachweis eignet sich für die Untersuchung von Kot- und Darmschleimhautproben sowie postmortal für die Untersuchung von Mesenteriallymphknoten. Der Erreger wird dabei mit der ZIEHL-NEELSEN Färbung (ZIEHL, 1882; NEELSEN, 1885) dargestellt. Charakteristisch sind schlanke, rot gefärbte, in Nestern angeordnete Stäbchen. Einzeln liegende säurefeste Stäbchen können nicht als Indiz für eine MAP-Infektion gewertet werden, da es sich dabei um atypische, saprophytäre Mykobakterien handeln könnte, die auch im Kot gesunder Tiere vorkommen. Die Mikroskopie wird oft zur Bestätigung einer klinischen Verdachtsdiagnose durchgeführt, eignet sich aber wegen der geringen Sensitivität nicht zur Erkennung von subklinisch infizierten Tieren (MERKAL et al., 1968). Sie wird auch zur Absicherung klinischer Fälle in Verbindung mit serologischen Methoden empfohlen (SCHLIESSER und SCHAAL, 1984). Der direkte mikroskopische Nachweis von MAP gelingt allerdings nur in 25-35% der kulturell

positiven Kotproben, bzw. in 60% der kulturell positiven Lymphknoten (HIETALA, 1992).

#### *Kultureller Erregernachweis*

Der kulturelle Nachweis von MAP aus Kot- und Gewebeproben ist seit über hundert Jahren die wichtigste Nachweismethode (COLLINS, 1996). Die Identifizierung des Erregers basiert dabei auf folgenden Merkmalen: Säurefestigkeit, langsames Wachstum und Mycobactin-Abhängigkeit. Zusätzlich zu ihrer analytischen Spezifität besitzt die Kultur noch andere Vorteile. Sie ermöglicht die Erkennung von inapparent infizierten Tieren, die den Erreger im Kot ausscheiden und damit als Infektionsquelle in einer Herde anzusehen sind. Das infizierte Tier kann während der Infektion unterschiedliche grosse Erregerzahlen im Kot ausscheiden (CHIODINI, 1996). Im Spätstadium der Erkrankung findet offensichtlich eine stärkere Erregerausscheidung statt. Nachteile der Kultur sind die für MAP erforderliche lange Inkubationszeit von bis zu 16 Wochen, die geringe Sensitivität und die hohen Kosten. Ein wesentlicher Nachteil ist die geringe Sensitivität der Kultur, die auf ungefähr 50% geschätzt wird (SOCKETT und COLLINS, 1992).

### **4.3.2 Indirekter Erregernachweis**

#### *Nachweis spezifischer Antikörper*

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) war der erste serologische Test, der für die Diagnose der Paratuberkulose beschrieben wurde (BANG und ANDERSEN, 1913; TWORT und INGRAM, 1912). Die Angaben über Sensitivität und Spezifität sind sehr unterschiedlich. In einigen Studien beschrieben die Autoren den Test als nur wenig spezifisch und sensitiv (COCITO et al., 1994), in anderen waren die Ergebnisse durchaus vergleichbar mit denen anderer serologischer Methoden (Collins, 1996). Kreuzreaktionen wurden mit *M. bovis* und *M. avium* beschrieben, so dass die KBR nur in tuberkulosefreien Rinderbeständen zu auswertbaren Ergebnissen führt (BANG und ANDERSEN, 1913). Weiterhin können Kühe, die mit *Corynebacterium renale* infiziert sind, bei der Untersuchung ihres Serums falsch positiv reagieren (GILMOUR u. GOUDSWAARD, 1972). Bezogen auf die Kotkultur konnte für die KBR eine Sensitivität von 10,8% und eine Spezifität von 97,4% bei subklinisch infizierten Rindern ermittelt werden (SHERMAN et al., 1990). Die mangelnde Sensitivität schränkt die Eignung der KBR als Verfahren zur

Einzeltierdiagnostik sehr stark ein, so dass dieses Verfahren lediglich als Screening-Test angewendet werden sollte (BELLETTI et al., 1992).

Agargelimmunodiffusionstest (AGIDT) stellt ein preiswertes und schnelles Diagnoseverfahren dar. Die Adsorption der Patientenseren mit *M. phlei* konnte die Spezifität des Tests erhöhen (MERKAL et al. 1984). Die Sensitivität ist jedoch geringer als die des ELISA. Die Methode zeigt nur dann ein positives Ergebnis, wenn der Erreger in grossen Mengen ausgeschieden wird. In einer Untersuchung von SHERMAN et al. (1990) konnten eine Sensitivität von 18,9% und eine Spezifität von 99,4% berechnet werden. Dieser serologische Test eignet sich nur als zusätzliche Methode zur Absicherung der Diagnose von klinisch erkrankten Tieren (SHERMAN et al., 1984; BLOOD und RADOSTITS, 1989). Für die Beurteilung subklinisch infizierter Rinder wird das Verfahren als unzuverlässig bewertet (GOUDSWAARD et al., 1976; SHERMAN, 1987).

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde erstmals im Jahr 1971 von ENGWALL und PERLMANN beschrieben und sieben Jahre später als diagnostisches Verfahren für den Nachweis der Paratuberkulose eingeführt (JØRGENSEN und JENSEN, 1978). In den darauffolgenden Jahren wurden einige unterschiedliche Modifikationen des MAP-ELISA entwickelt. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der Präparation und der Qualität des Antigens, welches zum Beschichten der Mikrotiterplatten benutzt wird. In einigen Arbeiten wurden die Antigene aus einem MAP Stamm 18 isoliert, der sich später aufgrund der molekularbiologischen Identifizierung als *M. avium* ssp. *avium* Stamm 18 herausstellte (CHIODINI, 1993). Auch ein Zellwandbestandteil, das sog. Lipoarabinomannan (LAM), wird als Antigen bei einigen ELISA-Systemen eingesetzt (JARK, 1996; SUGDEN et al. 1986,1989; SWEENEY et al., 1994). Die in der eigenen Studie eingesetzten ELISA-Systeme (Svanovir®- und Pourquier®-Elisa) unterscheiden sich hauptsächlich in dem verwendeten Antigen, mit dem die Mikrotiterplatte beschichtet ist und in der Präadsorption der zu untersuchenden Seren mit *M. phlei*. Beim Svanovir®-ELISA wird keine Präadsorption durchgeführt. Für die Erkennung subklinisch infizierter Tiere weisen viele der entwickelten ELISA-Kits eine zu geringe Sensitivität und Spezifität auf (BECH-NIELSEN et al., 1992; COLLINS et al., 1991). Einige Verfahren zeigen eine erhöhte Spezifität, wenn die Proben vor dem Testen mit *M. phlei*-Extrakten präadsorbiert werden. Dabei werden unspezifische Antikörper gebunden (YOKOMIZO et al., 1985). In einem ELISA-System, bei dem die Seren mit *M. phlei*

absorbiert werden, wurden eine Sensitivität von 57% und eine Spezifität von 98,9% erreicht (MILNER et al., 1990). Für ein ähnliches ELISA-System wurde eine Sensitivität von 50,9% und eine Spezifität von 94,9% ermittelt (COLLINS et al., 1994). SWEENEY et al. (1995) konnten die Sensitivitätsunterschiede eines kommerziellen ELISA-Systems (IDEXX Laboratories) im Vergleich zur kulturellen Kotuntersuchung in den unterschiedlichen Stadien der Infektion demonstrieren. So betrug die Sensitivität bei geringgradig ausscheidenden Rindern (subklinisch infiziert) nur 15%. In klinisch erkrankten Tieren dagegen betrug sie 87%. Im Mittel ergab sich eine Sensitivität von 45% bei einer Spezifität von 99%. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass zu Beginn eines Sanierungsprogrammes ca. 50% der betroffenen Tiere mittels ELISA erkannt und ausgemerzt werden können. Mit sinkender Seroprävalenz in einem Rinderbestand verringert sich auch die Wahrscheinlichkeit, infizierte Tiere serologisch identifizieren zu können (COLLINS, 1996). Der Vorteil einiger ELISA-Tests ist, dass auch Milchproben getestet werden können und dass sie auch für andere Wiederkäuer eingesetzt werden können (BURNSIDE et al., 1994; MILNER et al., 1989).

#### *Nachweis der zellvermittelten Immunantwort*

Die erste und stärkste Reaktion auf mykobakterielle Infektionen bei Mensch und Tieren ist eine zellvermittelte Immunantwort (Collins, 1996). Zur Prüfung der zellulären Immunantwort wird ein MAP-Extrakt, das sog. Johnin, genau wie beim Tuberkulin-Hauttest intrakutan injiziert. Es treten dann zwei Reaktionen auf. Die erste ist eine allergische Reaktion vom Soforttyp, welche eine ödematöse Schwellung verursacht. Dabei handelt es sich aber um eine unspezifische Reaktion, die aufgrund der Sensibilisierung gegenüber anderen Mykobakterien ausgelöst wird. Die zweite Reaktion, die zelluläre Immunantwort vom verzögerten Typ, wird als spezifisch bewertet und tritt 24 bis 72 h nach der Injektion auf und ist durch eine Umfangsvermehrung an der Injektionsstelle gekennzeichnet (MERKAL, 1973). Dieser Test kann auch intravenös durchgeführt werden. Der Intradermaltest hat heute nur eine eingeschränkte Bedeutung für die Diagnose der Paratuberkulose, da positive Reaktionen nur zu Beginn der Erkrankung auftreten und es aufgrund von Kreuzreaktionen zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann (De LISLE et al., 1980; BENEDICTUS und BOSMA, 1985).

Der Hauttest ist durch den „in vitro“ Nachweis von Cytokinen ersetzt worden. Cytokine sind chemische Mediatoren und Modulatoren der Immunantwort. Viele davon werden von T-Lymphozyten synthetisiert. Diese peripheren Blutzellen können durch ein geeignetes Antigen stimuliert werden. Mittels eines quantitativen Verfahrens kann bestimmt werden, ob ein Tier mit MAP infiziert wurde bzw. sich mit dem Erreger auseinander gesetzt hat. Der erste Cytokintest für den Nachweis einer Infektion mit MAP wurde von Dr. Paul Wood bei der *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation* (CSIRO) in Australien entwickelt. In diesem Test wird als stimulierendes Antigen ein MAP-Extrakt eingesetzt und die Produktion von  $\gamma$ -Interferon als Marker für eine Reaktion der zellvermittelten Immunantwort gemessen.

Durch den Nachweis zellulärer Immunitätsmechanismen können MAP-infizierte Tiere früher als positiv erkannt werden als durch den Nachweis humoraler Antikörper oder den direkten Erregernachweis etwa im Kot (ROTHEL und JONES, 1990).

## **5 Material und Methoden**

### **5.1 Probenmaterial**

In der vorliegenden serologischen Studie wurden insgesamt 673 Serumproben untersucht. 38 Proben stammten aus einer früheren Untersuchung zur Verbreitung der Paratuberkulose in Kuhherden in der Schweiz. In dieser Studie wurden kulturelle und serologische Nachweismethoden (ELISA) miteinander verglichen (GLANEMANN et al., 2004). Zusätzlich wurden 103 Blutproben von Klinikpatienten der Nutztierklinik des Tierspitals Zürich gesammelt (Krankheitsgeschichte unbekannt oder mit Krankheitssymptom „Durchfall“) und 532 Serumproben aus einer Serumbank (PD Dr. Michael Hässig, Abteilung Bestandesmedizin, Tierspital Zürich) willkürlich ausgewählt. Die Auswahl der zu untersuchenden Seren aus der Serumbank erfolgte nach folgenden Kriterien: geografische Lage der Bauernhöfe (Kanton) und Grösse des Bestandes. Die Anzahl der zu untersuchenden Serumproben pro Kanton wurden statistisch je nach Rinderpopulationsgrösse bestimmt (KISH & LESLIE, Survey Sampling, John Wiley & Sons, NY, 1965). Für die Paratuberkulose wurde eine Prävalenz von 10% geschätzt und eine Genauigkeit von 5% vorgegeben. Die Probenzahl wurde nach der Formel

folgendermassen berechnet:  $100 \% = 138 \times Q \times 4 \Rightarrow 1\% = 5,52 \times Q$  (Q= Anzahl Kühe). Der Anteil der Rinderpopulation jedes Kantons (%) wurde mit diesem Wert multipliziert und die Probenzahl für die Untersuchung ermittelt. Die Verteilung der Anzahl der Serumproben auf die verschiedenen Kantone ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Verteilung der untersuchten Rinderserumproben aus der Serumbank auf die einzelnen Kantone

Kanton	Anzahl der untersuchten Serumproben
Aargau	33
Appenzell I.Rh	8
Appenzell A.Rh	5
Basel-Landschaft	10
Basel-Stadt	1
Bern	109
Freiburg	47
Genf	1
Glarus	5
Graubünden	26
Jura	18
Luzern	49
Neuchâtel	13
Nidwalden	5
Obwalden	7
Schaffhausen	5
Schwyz	16
Solothurn	15
St. Gallen	49
Thurgau	27
Tessin	4
Uri	5
Wallis	11
Vaud	42
Zug	7
Zürich	35

## 5.2 Vorbereitung des Antigens für die Präadsorption

Bakterienstämme

*M. avium* ssp. *avium* (ATCC 25291)

*M. phlei* (ATCC 43214)

*M. avium* ssp. *paratuberculosis* (ATCC19698)

Middlebrook-Medium

6 g/l MB 7H9 (Becton Dickinson, Basel, CH)

100 ml/l OADC- Enrichment (Becton Dickinson, Basel, CH)

ad 1000 ml A. dest

Gasperlen (0,75-1 mm; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe)

Reagenz A: 5.0 ml Natriumcarbonat (2%)

50 µl Natriumtartrat

50 µl Kupfersulfat

Reagenz B 200 µl FCP + 300 µl A. dest.

Die Bakterienstämme *M. avium* ssp. *avium*, *M. phlei* und *M. avium* ssp. *paratuberculosis* wurden in Middlebrook-Medium in Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>, Fa Greiner, Basel) kultiviert und regelmässig mittels PCR-RFLP-Analyse (GLANEMANN et al., 2004) auf Identität geprüft. Der Inhalt jeder Kulturflasche wurde in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (15 min, +4°C und 4500xg). Danach wurde der Überstand entfernt und das Sediment in 10 ml PBS-Lösung resuspendiert und gewaschen. Das erhaltene Sediment wurde mit 5 ml PBS resuspendiert. Die Suspensionen wurden vor dem weiteren Gebrauch mit Gasperlen (0,75-1 mm; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) homogenisiert. Die Proteinkonzentration der Suspensionen wurde mit der Micro-Lowry Methode durchgeführt (LOWRY et al., 1951). Dazu wurden die Suspensionen 1:2, 1:5, 1:10 und 1:100 mit A. dest. verdünnt. Als Positivkontrolle wurde Serumalbumin verwendet.

500 µl Reagenz A wurden zu jeder Probe pipettiert und die Proben 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 50 µl des zweiten Reagenz B dazupipetiert. Dabei bildet sich ein blauer Komplex mit Kupferionen, welcher ein Mass für die Proteinkonzentration ist. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl jeder Probe im Doppelansatz in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Proteinkonzentration spektrometrisch bestimmt (TECAN®, bei 510nm). A. dest.



diente als Nullwert. Die effektive Proteinkonzentration der Suspensionen konnte aus einer Standardkurve abgelesen werden. Diese Standardkurve wurde mit den Werten von verschiedenen Serumalbumin-Konzentrationen bestimmt. Für alle Mykobakterien-Stämme wurde eine Proteinkonzentration von 1,5 mg/dl für die Adsorptionsversuche in den ELISA-Testsystemen ausgewählt.

### 5.3 Serologische Untersuchungen

Für die Untersuchung der Serumproben standen zwei verschiedene kommerziell erhältliche ELISA-Kits zur Verfügung: Svanovir®-ELISA (SVANOVA Biotech AB, Uppsala, Sweden) und Pourquier®-ELISA (Insitut Pourquier, Montpellier, France).

Die 38 Serumproben aus der Dissertation GLANEMANN (GLANEMANN et al., 2004) wurden zuerst ohne Präadsorption in beiden ELISA-Tests untersucht. Daneben wurden diese Serumproben über Nacht mit drei verschiedenen Adsorbentien präadsorbiert (*M.avium* ssp. *avium* ATCC 25291, *M.phlei* ATCC 43214, *M.avium* ssp. *paratuberculosis* ATCC 19698) und anschliessend in beiden ELISA-Tests untersucht. Dabei wurde folgende Plattenbelegung verwendet:

	1	2	3	...	12
A	POS KONTR	Probe Nr.1 unverdünnt	Probe Nr.2 unverdünnt	...	Probe Nr.11 unverdünnt
B	POS KONTR	Probe Nr.1 unverdünnt	Probe Nr.2 unverdünnt	...	Probe Nr.11 unverdünnt
C	NEG KONTR	Probe Nr.1 mit <i>M. avium</i> adsorbiert	Probe Nr.2 mit <i>M. avium</i> adsorbiert	...	Probe Nr.11 mit <i>M. avium</i> adsorbiert
D	NEG KONTR	Probe Nr.1 mit <i>M. avium</i> adsorbiert	Probe Nr.2 mit <i>M. avium</i> adsorbiert	...	Probe Nr.11 mit <i>M. avium</i> adsorbiert
E		Probe Nr.1 mit <i>M. phlei</i> adsorbiert	Probe Nr.2 mit <i>M. phlei</i> adsorbiert	...	Probe Nr.11 mit <i>M. phlei</i> adsorbiert
F		Probe Nr.1 mit <i>M. phlei</i> adsorbiert	Probe Nr.2 mit <i>M. phlei</i> adsorbiert	...	Probe Nr.11 mit <i>M. phlei</i> adsorbiert
G		Probe Nr.1 mit <i>M. paratuberculosis</i> ads.	Probe Nr.2 mit <i>M. paratuberculosis</i> ads.	...	Probe Nr.11 mit <i>M. paratuberculosis</i> ads.
H		Probe Nr.1 mit <i>M. paratuberculosis</i> ads.	Probe Nr.2 mit <i>M. paratuberculosis</i> ads.	...	Probe Nr.11 mit <i>M. paratuberculosis</i> ads.

Die übrigen 635 Seren wurden zuerst mit dem Svanovir®-ELISA nach Angaben des Herstellers untersucht. Alle Seren, die in diesem ELISA entweder positiv oder fraglich getestet wurden, wurden zusätzlich mit dem Pourquier®-ELISA untersucht.

### 5.3.1 Svanovir®-Elisa

Material:

495 µl Blutserum

PBS-Tween-Pufferlösung: 1/20 verdünnt

HRP-Konjugat (Antikörper gegen bovines IgG1)

Substratlösung

Stopplösung

Alle in diesem Test gebrauchten Lösungen wurden vom Hersteller geliefert und alle Untersuchungsschritte strikt nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Sowohl Proben als auch negative und positive Kontrollen wurden 1/100 mit der PBS-Tween-Pufferlösung verdünnt. Nur Proben mit speziellen Adsorbentien wurden nach der Verdünnung über Nacht bei +4°C vorinkubiert.

100 µl jeder Probe, sowie Positiv- und Negativkontrolle, wurden im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und die Platte auf einem Schüttler (Fa. Bühler, Basel) bei Raumtemperatur während 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit der PBS-Lösung wurden pro Kavität 100 µl des HRP-Konjugats (Antikörper gegen bovines IgG1) zugegeben und die Mikrotiterplatte dann 30 min auf einen Schüttler gestellt. Es folgte wieder ein dreimaliges Waschen. Nach Zugabe von 100 µl Substratlösung zu jeder Vertiefung wurde die Platte nochmals 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Stopplösung (50 µl/Kavität) gestoppt. Die optische Dichte (OD) wurde bei 450 nm innert 15 min gemessen (TECAN, Schweiz).

Die Kriterien für die Validierung des Testes waren folgendermassen definiert:

Die OD-Werte (Doppelansatz) der positiven Kontrolle dürfen nicht mehr als 25% voneinander abweichen und der OD-Wert der positiven Kontrolle muss grösser als 1.00 sein.

### 5.3.2 Pourquoiier®-Elisa

Material:

570 µl Blutserum

Test-PBS-Lösung: 1/20 verdünnt

Konjugat: Peroxidase-markiert (Antikörper gegen bovines IgG)

Substrat

Alle verwendeten Lösungen wurden vom Hersteller geliefert. Der Test (ELISA für Paratuberkulose Version P07110/17) wurde nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Proben wurden 1/20 mit einer ein *M. phlei*-Extrakt enthaltenden Pufferlösung verdünnt und 15 min bei +21°C inkubiert. Proben mit speziellen Adsorbentien wurden nach der Verdünnung mit normaler PBS-Lösung über Nacht bei +4°C inkubiert. Proben, die unadsorbiert zu testen waren, wurden nur mit PBS-Lösung verdünnt.

Auf jeder Platte wurde eine positive und eine negative Kontrolle mitgeführt.

100µl jeder Probe wurden in die prädefinierten Vertiefungen auf die Mikrotiterplatte pipettiert und während 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (Bühler, Basel) inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde das Konjugat dazugegeben und während 30 min weiter inkubiert. Danach wurde wieder mit PBS gewaschen (100 µl/Kavität). Es folgte die Zugabe von 100µl Substratlösung in jede Vertiefung. Zuletzt wurde die Stopplösung zu allen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert.

Die optische Dichte (OD) wurde mit einem Spektrometer (TECAN, Schweiz) bei 450nm gemessen. Die korrigierten OD-Werte (cOD) für jede Serumprobe wurden wie folgt berechnet:

$$cOD_{450} = OD_{450}\text{-Wert Antigen-beschichtete Vertiefung} - OD_{450}\text{-Wert unbeschichtete Vertiefung}$$

Der Test ist auswertbar, wenn der unkorrigierte  $OD_{450}$ -Wert der positiven Kontrolle  $\geq 0.350$  ist und das Verhältnis zwischen dem korrigierten  $OD_{450}$ -Wert der positiven Kontrolle und dem korrigierten  $OD_{450}$ -Wert der negativen Kontrolle  $\geq 3,5$  beträgt.

## 6 Ergebnisse

Gegenstand der Untersuchungen war der Vergleich zweier kommerziell erhältlicher ELISA-Kits (Svanovir<sup>®</sup>-ELISA, Pourquier<sup>®</sup>-ELISA) zur Bestimmung von MAP-spezifischen Antikörpern in Rinderseren.

### 6.1 Untersuchung von Rinderseren in beiden Testverfahren mit und ohne Präadsorption

Zunächst wurden 38 Serumproben, die im Rahmen einer Dissertation (GLANEMANN et al., 2004) gesammelt wurden, untersucht. Diese Seren konnten aufgrund der bereits durchgeführten serologischen Untersuchung mit dem Svanovir<sup>®</sup>-Elisa in drei Gruppen eingeteilt werden:

- Gruppe 1: Svanovir<sup>®</sup>-ELISA-positiv, n = 18
- Gruppe 2: Svanovir<sup>®</sup>-ELISA-fraglich, n = 11
- Gruppe 3: Svanovir<sup>®</sup>-ELISA-negativ, n = 9

Alle 38 Serumproben wurden im ersten Schritt der Arbeit mit den beiden zur Verfügung stehenden ELISA-Systemen vergleichend untersucht. Dabei wurden beide Testsysteme nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 1: Ergebnisse der Untersuchung von 38 Serumproben mit dem Svanovir<sup>®</sup>- und dem Pourquier<sup>®</sup>-ELISA

Verwendeter ELISA	positiv	fraglich	negativ
Svanovir <sup>®</sup> -ELISA (GLANEMANN et al., 2004)	18 (47%)	11 (29%)	9 (24%)
Svanovir <sup>®</sup> -ELISA	20 (52%)	9 (24%)	9 (24%)
Pourquier <sup>®</sup> -ELISA	6 (16%)	0 (0%)	32 (84%)

Die beiden verwendeten ELISA-Systeme unterscheiden sich in einem Punkt wesentlich voneinander. Beim Pourquier<sup>®</sup>-ELISA werden die zu untersuchenden Serumproben zuerst mit *M. phlei* präadsorbiert, der im Verdünnungspuffer des Pourquier<sup>®</sup>-ELISA bereits enthalten ist. Zur Aufklärung der Fragestellung, ob die

Abweichung der Ergebnisse mit der Präadsorption der Proben zusammenhängt, wurde der Pourquier®-ELISA zunächst ohne die vom Hersteller vorgeschriebene Präadsorption durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die so erhaltenen Ergebnisse denen des Svanovir®-ELISAs sehr ähnlich waren (18 positive Testseren).

Deshalb wurde im nächsten Schritt der Pourquier®-ELISA ohne diesen Adsorptionsschritt durchgeführt, zur besseren Interpretation der in Tabelle 1 dargestellten divergierenden Ergebnisse. Dazu wurden die Proben in reiner PBS-Lösung verdünnt und ihre Reaktivität untersucht.

Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der im Test positiven von 6 Serumproben auf die dreifache Zahl, nämlich 18 Serumproben, deutlich anstieg. Die Anzahl der MAP-positiven Serumproben entsprach also im wesentlichen der im Svanovir®-ELISA als positiv getesteten Rinderseren. Die Anzahl der als fraglich getesteten Serumproben blieb nahezu unverändert.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im nächsten Schritt die Beeinflussung der Testergebnisse durch eine Präadsorption der zu untersuchenden Seren näher untersucht. Dazu wurden alle 38 Seren über Nacht mit drei verschiedenen Adsorbentien (*M. avium* ssp. *avium*, *M. phlei*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* ATCC19698) adsorbiert und mit den beiden ELISA-Kits auf ihre Reaktivität mit MAP-Antigenen untersucht. Die Resultate sind für den Svanovir®-ELISA in Tabelle 2 und für den Pourquier®-ELISA in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 2: Ergebnisse der Untersuchung von 38 Serumproben mit dem Svanovir®-ELISA (verschiedene Adsorbentien)

Verwendete Adsorbentien	positiv	fraglich	negativ
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	0 (0%)	0 (0%)	38 (100%)
<i>M. phlei</i>	5 (13%)	1 (3%)	32 (84%)
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	0 (0%)	0 (0%)	38 (100%)

Tabelle 3: Ergebnisse der Untersuchung von 38 Serumproben mit dem Pourquier®-ELISA (verschiedene Adsorbentien)

Verwendete Adsorbentien	positiv	fraglich	negativ
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	0 (0%)	0 (0%)	38 (100%)
<i>M. phlei</i>	7 (19%)	0 (0%)	31 (81%)
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	0 (0%)	0 (0%)	38 (100%)

Vergleicht man die Resultate beider Tests in diesem Adsorptionsversuch so fällt auf, dass eine Serumprobe (Nr.16), die mit dem Svanovir®-ELISA nach Präadsorption mit *M. phlei* als fraglich bewertet wurde, mit dem Pourquier®-ELISA ein positives Resultat ergab. Eine andere Serumprobe (Nr.188) war im Svanovir®-ELISA nach Präadsorption mit *M. phlei* fraglich, aber nach der gleichen Präadsorption im Pourquier®-ELISA negativ.

## 6.2 Untersuchung von Rinderseren aus der Klinik und aus einer Serumbank

Zur weiteren Validierung der ELISA-Kits und zur Bestätigung der Ergebnisse des ersten Versuches wurden 103 Serumproben von Rindern der Klinik für Nutztiere des Tierspitals Zürich gesammelt. Die Krankheitsgeschichte dieser Tiere ist unbekannt. Daneben wurden 532 Proben aus einer Rinderserumbank nach verschiedenen Kriterien (geografische Lage, Bestandesgrösse) ausgewählt.

Alle 635 Rinderseren wurden zunächst mit dem Svanovir®-ELISA getestet. Bei fraglichen oder positiven Resultaten wurden diese Seren anschliessend mit dem Pourquier®-ELISA geprüft.

Im Svanovir®-ELISA reagierten 70 der 635 untersuchten Proben (11%) positiv, 65 Serumproben wurden als fraglich detektiert (10%) und 500 (79%) reagierten negativ. Von den 135 positiv bzw. fraglich mit Svanovir®-ELISA getesteten Serumproben wurden nur zwei Proben bei der Untersuchung im Pourquier®-ELISA als MAP-positiv detektiert. Eine dieser MAP-positiven Serumproben stammte von einer im Tierspital Zürich hospitalisierten Kuh (gehört zu den 103 Seren, die in der Klinik gesammelt wurden), die an Paratuberkulose litt (Pathologie und mikroskopische Untersuchung

des Kotes). Die zweite positive Serumprobe gehörte zur Serumbank und kam aus einem Bestand im Kanton Appenzell. Die Krankheitsgeschichte dieser serologisch als MAP-positiv getesteten Kuh ist unbekannt.

Auf jeder ELISA-Platte wurden immer mindestens drei Kontrollseren mitgetestet. Diese stammten von an Paratuberkulose erkrankten Kühen. Diese Proben reagierten in beiden ELISA-Kits durchgehend positiv.

## **7 Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit sollte die diagnostische Wertigkeit von zwei kommerziell erhältlichen ELISA-Testkits (Pourquier®-ELISA, Svanovir®-ELISA) untersucht werden. Die Testsysteme unterscheiden sich insbesondere darin, dass im Pourquier-Test die Serumproben zur Minimierung möglicher Kreuzreaktionen präadsorbiert werden, während im Svanovir-Test unbehandelte Serumproben untersucht werden können. In unseren eigenen Untersuchungen wurden nun anhand von definierten Serumproben beide ELISA-Testkits miteinander verglichen. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf den Einfluss einer allfälligen Präadsorption der Testseren auf den Testausgang gelegt.

Zunächst wurden beide ELISA-Kits nach den Angaben der Hersteller durchgeführt und 38 bereits in Vorversuchungen näher definierte Seren untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die in der aktuellen Untersuchung mit dem Svanovir®-ELISA erhaltenen Ergebnisse sehr ähnlich mit den serologischen Ergebnissen aus der Voruntersuchung waren (GLANEMANN et al., 2004). Diese Untersuchungen wurden ebenfalls mit dem Svanovir®-ELISA durchgeführt. Diese Beobachtung spricht für eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im Svanovir®-ELISA. Werden die Ergebnisse des Svanovir®-ELISAs allerdings mit denen des Pourquier®-ELISA verglichen, so konnten eindeutige Diskrepanzen gefunden werden. Im Pourquier®-ELISA reagierten nur sechs der 20 Seren, die im Svanovir®-ELISA als MAP positiv detektiert wurden, ebenfalls positiv. Auch die relativ hohe Zahl an fraglichen Resultaten aus dem Svanovir®-ELISA konnte im Pourquier®-ELISA nicht reproduziert werden. Deshalb wurde in den nächsten Schritten untersucht, ob diese auffällige Abweichung der Ergebnisse unter Umständen mit der beim Svanovir®-ELISA fehlenden Präadsorption der Serumproben mit *M. phlei* zusammenhängen könnte.

Im nächsten Schritt wurden nun die zu untersuchenden Serumproben mit drei verschiedenen Adsorbentien (*M. avium* ssp. *avium*, *M. phlei*, MAP) über Nacht präadsorbiert und anschliessend mit beiden ELISA-Testkits auf ihre Reaktivität mit MAP getestet. Wie zu erwarten führte eine Präadsorption mit MAP, aber auch mit *M. avium* ssp. *avium* zu einem vollständigen Verlust der Reaktivität der Serumproben in beiden Testsystemen. Diese Beobachtung bestätigte also, dass zwischen MAP und *M. avium* ssp. *avium* eine starke antigenetische Verwandtschaft besteht (Camphausen et al., 1988). Eine Präadsorption der Serumproben mit *M. phlei* dagegen führte zu einer vergleichbaren Anzahl an positiv-getesteten Serumproben in beiden ELISA-Kits (Svanovir<sup>®</sup>-ELISA: sieben, Pourquier<sup>®</sup>-ELISA: fünf). Diese Anzahl positiver Seren entsprach annähernd der Anzahl der im Pourquier<sup>®</sup>-ELISA als positiv getesteten Seren (6 positive Seren), wenn dieser exakt nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Dass dieser Effekt einer *M. phlei*-Präadsorption nicht auf möglicherweise vorhandene Ig-bindende Eigenschaften von *M. phlei* zurückzuführen war, konnte durch die Untersuchung der Auswirkung einer *M. phlei*-Präadsorption auf die Reaktivität von Schweine- und Kaninchenserum in anderen ELISA-Systemen (Chlamydien-ELISA) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

In unserer Studie wurden eine für die schweizerische Rinderpopulation repräsentative Anzahl von Serumproben mit folgenden Resultaten untersucht:

1. Auf der Basis des Pourquier<sup>®</sup>-ELISAs konnte eine MAP-Seroprävalenz von ungefähr 0.2 % nachgewiesen werden. Dieser Wert entspricht früheren serologischen Untersuchungen in der Schweiz (0.7 %, STÄRK et al., 1997) und spricht nicht für eine Paratuberkulose-Problematik in den schweizerischen Rinderbeständen.
2. Die ELISA-Technik ist ein geeigneter Screening-Test auf Herdenbasis. Sie erlaubt einen schnellen und preisgünstigen Überblick des Infektionssatus einer Herde. Der ELISA kann zusammen mit einer anderen Nachweismethode als Bestätigung der Diagnose MAP-Infektion eingesetzt werden.

Insgesamt gesehen ergab der Vergleich der Ergebnisse des Svanovir<sup>®</sup>-ELISA und des Pourquier<sup>®</sup>-ELISA, beide durchgeführt nach Angaben des Herstellers, eine höhere Spezifität für den Pourquier<sup>®</sup>-ELISA. Unsere Untersuchungen haben



eindeutig gezeigt, dass diese höhere Spezifität mit dem Präadsorptions-Schritt der Testseren mit *M. phlei* zusammenhängt. Damit konnten wir die Ergebnisse von Milner et al. (1987; 1989; 1990) und Yokomizo et al. (1985) bestätigen, wonach der Nachweis von MAP-Antikörpern in *M. phlei*-adsorbierten Seren bei deutlicher Verringerung falsch positiver Reaktionen eine vergleichbar hohe Sensitivität aufweist wie die Untersuchung unbehandelter Seren. Dies führt letztendlich zu einer Erhöhung der Spezifität der Testsysteme. Die Ergebnisse des Svanovir<sup>®</sup>-ELISA vor und nach Präadsorption mit *M. phlei* zeigten eindeutig, dass die im Test enthaltene Antigenpräparation auch heterologe Antikörper binden kann und somit nicht streng spezifisch für MAP ist.

## 8 Literaturverzeichnis

BANG, O., C.W. ANDERSEN (1913): Einige Untersuchungen über komplementbindende Antistoffe bei experimenteller und spontaner Tuberkulose sowie paratuberkulöser Darmentzündung des Rindes. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig.* 69, 517-38.

BECH-NIELSEN, S., J.B. JØRGENSEN, P. AHRENS, N.C. FELD (1992): Diagnostic accuracy of a Mycobacterium phlei-absorbed serum ELISA for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows. *J. Clin. Microbiol.* 30, 613-8.

BELLETTI, G., N. ARRIGONI, G. SALI (1992): Paratuberkulose des Rindes: klinisch-epidemiologische Untersuchungen und Erfahrungen mit einem Bekämpfungsprogramm. *Tierärztl. Umschau* 47, 328-330.

BENEDICTUS, G., J. BOSMA (1985): The intravenous administration of johnin in the diagnosis of paratuberculosis in practice. *The Vet. Quarterly* 7, 139-145.

BLOOD, D.C., O.M. RADOSTITS (1989): Veterinary Medicine, 7. Aufl., Baillière, Tindall, London, 722-729.

BRAUN, R.K., C.D. BUERGELT, R.C. LITTELL, S.B. LINDA, J.R. SIMPSON (1990): Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to estimate prevalence of paratuberculosis in Florida. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 1251-1254.

BRENNAN, P. J., H. NIKAIDO (1995): The envelope of mycobacteria. *Annu. Biochem.* 64, 29-63.

BURNSIDE, D.M., ROWLEY, B.O. (1994): Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paratuberculosis in goats. *Am. J. Vet. Res.* 55, 465-466.

CAMPHAUSEN, R.T., JONES, R.L., BRENNAN, P.J. (1988): Antigenic relationship between *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Am. J. Vet. Res.* 49, 1307-1310.

- CHIODINI, R.J., J. HERMON-TAYLOR (1993): The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurisation. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 629-631.
- CHIODINI, R.J., C.A. ROSSITER (1996): Paratuberculosis a potential zoonosis? *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 457-467.
- CHIODINI, R.J., H.J. VAN KRUININGEN (1983): Eastern white-tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182, 168-169.
- CHIODINI, R.J., H.J. VAN KRUININGEN, R.S. MERKAL (1984): Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74, 218-262.
- CLARKE, C.J. (1997): The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* 116, 217-261.
- COCITO, C., P. GILOT, M. COENE, M. DE KESEL, P. POUPART, P. VANNUFFEL (1994): Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 328-345.
- COLLINS, M.T. (1994): Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 208-210.
- COLLINS, M.T. (1996): Diagnosis of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 357-371.
- COLLINS, M.T., D.C. SOCKETT, S. RIDGE, J.C. COX (1991): Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 29, 272-276.
- ENGWALL, E., P. PERLMANN (1971): Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Quantitative assay of Immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874.

GAY, J.M., D.M. SHERMAN (1992): Factors in the epidemiology and control of ruminant paratuberculosis. *Vet. Med.* 87, 1133-1139.

GILMOUR, N.J.L., J. GOUDSWAARD (1972): *Corynebacterium renale* as a cause of reactions to the complement fixation test for Johne's disease. *J. Comp. Path.* 82, 333-336.

GLANEMANN, B., L.E. HOELZLE, K. BOGLI-STUBER, T. JEMMI, M.M. WITTENBRINK (2004): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Swiss dairy cattle by culture and serology. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 146, 409-415.

GOUDSWAARD, J., N.L. GILMOUR, R.G. DIJKSTRA, J.J. VAN BEEK (1976): Diagnosis of Johne's disease in cattle: a comparison of five serological tests under field conditions. *Vet. Rec.* 98, 461-462.

HERMANN, L. (1998): *Mycobacterium paratuberculosis* and milk. *IFST* Aug 19/98, 19-28.

HIETALA, S.K. (1992): The options in diagnosing ruminant paratuberculosis. *Vet. Med.* 87, 1122-1132.

JARK, U. (1996): Etablierung eines ELISA zur Erkennung subklinischer Paratuberkulose-Infektionen beim Rind. *Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation.*

JØRGENSEN, J.B. (1977): Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nord. Vet. Med.* 29, 267-270.

JØRGENSEN, J.B., P.T. JENSEN (1978): Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for detection antyodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle. *Acta Vet. Scand.* 19, 310-312.

KALIS, C.H.J., M.T. COLLINS (2003): Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Vet. Microbiol.* 97, 73-86.

KENNEDY, D.J., G. BENEDICTUS (2001): Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev. Sci. Tech.* 20(1), 151-179.

KLEE, W. (1986): Paratuberkulose beim Rind: Diagnose und Bekämpfung. *Prakt. Tierarzt* 68, Collegium veterinarium XVII, 55-57.

LARSEN, A.B., K.E KOPECKY (1970): *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. *Am. J. Vet. Res.* 31, 255-258.

LARSEN, A.B., O.H.V. STAHLHEIM, D.E. HUGHES (1981): *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179, 169-171.

LIÉNAUX, E. (1913): Un cas d'enterite hypertrophiante chez le cheval. *Amm. Med. Vet.* 62, 197-200.

De LISLE, G.W., B.S. SAMAGH, J.R. DUNCAN (1980): Bovine paratuberculosis II. A comparison of fecal culture and the antibody response. *Can. J. Comp. Med.* 44, 183-191.

LOWRY, O.H., N.J. ROSENBOUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 19, 265-275.

MERKAL, R.S. (1984): Paratuberculosis: Advances in cultural, serologic and vaccination methods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184, 939-943.

MERKAL, R.S., A.B. LARSEN, K. E. KOPECKY, R.D. NESS (1968): Comparison of examination and tests methods for early detection of paratuberculous cattle. *Am. J. Vet. Res.* 29, 1533-1538.

MERKAL, R.S., K.R. RHOADES, J.E. GALLAGHER, A.E. RICHIE (1973): Scanning electron microscopy of mycobacteria. *Am. Rev. Resp. Dis.* 108, 382-387.

MERKAL, R.S., D.L. WHIPPLE, J.M. SACKS, G.R. SNYDER (1987): Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190, 676-680.

MILNER, A.R., LEPPER, A.W.D., SYMONDS, W.N., GRUNER, E. (1987): Analysis by ELISA and western blotting of antibody reactivities in cattle with *Mycobacterium paratuberculosis* after absorption of serum with *M. phlei*. *Res. Vet. Sci.* 42, 140-144.

MILNER, A.R., W.N. MACK, K.J. COATES, J. HILL, I. GILL, P. SHELDRIK (1990): The sensitivity and specificity of a modified ELISA for the diagnosis of Johne's disease from a field trial in cattle. *Vet. Microbiol.* 25, 131-137.

MILNER, A.R., W.N. MACK, K.J. COATES (1989): A modified ELISA for the detection of goats infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.* 66, 305-307.

NEELSEN, F. zitiert nach Johne, A. (1885): Ein zweifelloser Fall von congenitaler Tuberkulose. *Fortschr. Med.* 3, 198-202.

RICHARDS, W.D. (1988): The apparent effect of environmental acidity on the incidence of paratuberculosis. In: MERKAL, R. S., M. F. THOREL (Hrsg.): Second International Colloquium on Paratuberculosis, Laboratoire Central de Recherches Veterinaires, Maison-Alfort, France, 342-349.

ROSENBERGER, G. (1978): Infektionskrankheiten des Verdauungsapparates. In: G. ROSENBERGER (Hrsg): Krankheiten des Rindes, 2. Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg, 756-760.

ROTHEL, J.S., S.L. JONES, L.A. CORNER, et al (1990): A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for detection of tuberculosis in cattle. *Aust. Vet. J.* 67, 134-137.

RUNNELS, R.A. (1955): Case 17-paratuberculosis in a pig. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 127, 523-524.

SCANLAN, CHARLES MACK (1988): Introduction to veterinary bacteriology. Ames, Iowa. Iowa State University Press.

SCHLIESSER, T. und E. SCHAAL (1984): Prevalence and diagnosis of paratuberculosis in the Federal republic of Germany. Commision of the European Communities, Report EUR 9000, EN, 103-114.

SHERMAN, D.M. (1987): Highlights of the new Minnesota paratuberculosis rules revised march 17, 1986. *Bovine Pract.* 22, 131-132.

SHERMAN, D.M., J.F. MARKHAM, u. F. BATES (1984): Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185, 179-182.

SHERMAN, D.M., J.M. GAY, D.S. BOULEY, u. G.H. NELSON (1990): Comparison of the complement-fixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 51, 461-465.

SOCKETT, D.C., D.J. CARR & M.T. COLLINS (1992): Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DANN probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. *Can. J. Vet. Res.* 56, 148-153.

SPACKMAN, D. (1984): Johne's disease – current survey status. *Vet. Annu.* 24, 70-74.

STÄRK, K.D.C., C. FREI-STAEHELI, P.P. FREI, D.U. PFEIFFER, J. DANUSER, L. AUDIGE, J. NICOLET, M. STRASSER, B. GOTTSTEIN, U. KIHLM (1997): Incidence and costs of health problems in swiss dairy cattle and their calves (1993-1994). *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 139, 343-353.

SUGDEN, A., A.H. CORNER, B.S. SAMAGH, B.W. BROOKS, TURCOTTE, K.H. NIELSEN, R.B. STEWART, J.R. DUNCAN (1989): Serodiagnosis of ovine paratuberculosis, using lipoarabinomannan in a enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 6, 850-854.

SUGDEN, E.A., B.S. SAMAGH, D.R. BUNDLE, u. J.R. DUNCAN (1986): Lipoarabinomannan and lipid-free arabinomannan antigens of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 55, 762-770.

SUNG, N., M.T. COLLINS(1998): Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 999-1005.

SWEENEY, R.W. (1996): Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 305-312.

SWEENEY, R.W., R.H. WITHLOCK, C.L. BUCKLEY, P.A. SPENCER (1995): Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 488-493.

SWEENEY, R.W., R.H. WHITLOCK, C.L. BUCKLEY, P. SPENCER, A.E. ROSENBERGER, L.J. HUTCHINSON (1994): Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Am. J. Vet. Res.* 55, 905-909.

TAYLOR, T.K., C.R. WILKS , D.S. MC QUEEN (1981): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk of a cow with Johne's disease. *Vet. Rec.* 109, 532-533.

TWORT, F.W., G.L.Y INGRAM (1912): A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne* and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculous enteritis of bovines. *Proc. Roy. Soc. London* 84, 517-543.

VOGEL, O. (1970): Paratuberkulose bei einem Hund. *Berl. Muench. Tierärztl. Wochenschr.* 90, 419-421.



WEBER, A., M. ROTH, R. GUERKE-WERNER (1991): Paratuberkulose bei Damwild. *Vet. 9*, 21-23.

WHEELER, P.R., C. RATLEDGE (1994): Metabolism of *Mycobacterium paratuberculosis* in : B.R. BLOOM (Hrsg): Tuberculosis pathogenesis, protection, and control. *ASM Press, Washington, DC*, 360-363.

WHITLOCK, R.H. (1991): Laboratory diagnosis of Johne's disease. In: Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis, Orlando, FL, p.1.

WHITLOCK, R.H. (1991): An overview of Johne's disease. Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis. Orlando, FL, Sept 28- Oct 2, pp. 514-522.

YOKOMIZO, Y., H. YUGI, R.S. MERKAL (1985): A method for avoiding false-positive reactions in a enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Nippon Juigaku. Zasshi 47*, 111-119.

ZIEHL, F.H.P. (1882): Zur Färbung des Tuberkelbacillus. *Dtsch. Med. Wschr. 8*, 451.

## 9 Curriculum vitae

Name	Pamela Layla Monti
Geburtsdatum	27.06.1977
Geburtsort	Sorengo
Nationalität	Schweizerin
Heimatort	Cadempino, TI

1983 – 1988	Primarschule in Lamone-Cadempino
1988 – 1992	Sekundarschule in Savosa
1992 – 1996	Mittelschule in Lugano-Trevano
1996	Mittelschulabschluss, Maturität Typ C, Lugano-Trevano
1996 – 2002	Studium der Veterinärmedizin an der Universität Zürich
Dezember 2002	Diplom als Tierärztin

### Beruflicher Werdegang

2003 – 2004	Promotionsstudium am Institut für Veterinärbakteriologie der Universität Zürich
08.2004 – 11.2004	Assistentztierärztin in der Pferdeklinik Neugraben AG, Niederlenz
Februar 2005	Vertretung in Biologie, Liceo Lugano 2
10-11-12 Juni 2005	Tierärztlicher Dienst, Springkonkurrenz Curio
Sept. 05 – Juni 06	Lehrerin, Sekundarschule Ambri und Giubiasco
17–18 Sept. 2005	Tierärztlicher Dienst, Tessiner Meisterschaften, Springkonkurrenz, Curio
9-10-11 Juni 2006	Tierärztlicher Dienst, Springkonkurrenz Curio

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. M. M. Wittenbrink für die Bereitstellung des interessanten Themas und die beständige Betreuung.

Herrn Dr. Ludwig Hoelzle danke ich herzlich für seine ständige und freundliche Unterstützung, die wissenschaftliche Betreuung und Gesprächsbereitschaft sowohl im Labor als auch während der Abfassung dieser Arbeit.

Frau Dr. Katharina Hoelzle danke ich für die freundliche und kompetente Unterstützung im Labor.

Herrn PD Dr. Michael Hässig danke ich für die Hilfe in statistischen Fragen und die Seren aus der Serumbank.

Der ganzen Nutztierklinik danke ich herzlich für die Unterstützung bei der Probensammlung.

Priska Affolter danke ich für die freundliche Hilfsbereitschaft im Serologielabor vor allem bei der Problemlösung an Messgeräten.

Maya Diehl danke ich herzlich für ihre humorvolle Unterstützung im Büro und im Labor und für unsere konstruktiven Diskussionen.

Barbara Glanemann hat mir durch ihre Einführung in das Thema "Paratuberkulose" in den ersten Arbeitswochen sehr geholfen.

Ein besonderen Dank geht an meine Arbeitskollegen Tobias Rosenberger und Diana Sieber, die mit dazu beigetragen haben, dass die Arbeit im Labor und im Büro stets Freude gemacht hat.

Bei allen weiteren Mitarbeitern des Institutes möchte ich mich für die stete Hilfsbereitschaft und die nette Zusammenarbeit bedanken.

Ein spezieller Dank an Guido für die Lösung meiner tausend PC-Probleme.

Einen herzlichen Dank an meine Familie, die mich immer unterstützt und mir geholfen hat.